Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg
(Leiter: Prof. Dr. D. Wiebecke)

STUDIE ZUR POPULATIONSGENETIK DER PEPTIDASE A (E.C. 3.4.11) UND DES MITOCHONDRIALEN MALATENZYMS (E.C. 1.1.1.40) AUS LEUKOZYTEN IN DER BEVÖLKERUNG UNTERFRANKENS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Roswitha Kondler
aus Coburg

Würzburg, den 15. Juni 1982

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg
(Leiter: Prof. Dr. D. Wiebecke)

STUDIE ZUR POPULATIONSGENETIK DER PEPTIDASE A (E.C. 3.4.11) UND DES MITOCHONDRIALEN MALATENZYMS (E.C. 1.1.1.40) AUS LEUKOZYTEN IN DER BEVÖLKERUNG UNTERFRANKENS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Roswitha Kondler
aus Coburg

Würzburg, den 15. Juni 1982

Referent:	Prof. Dr. med. D. Wiebecke
Korreferent:	Prof. Dr. med. W. Schwerd
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	UNTERSUCHUNG IM SYSTEM DER PEPTIDASE A	
1.1.	Einführung und Problemstellung	1
1.2.	Material und Methoden	3
1.3.	Auswertung und Ergebnisse	8
1.4.	Diskussion	19
1.5.	Zusammenfassung	23
2.	UNTERSUCHUNG IM SYSTEM DES MALATENZYMS	
2.1.	Einleitung und Problemstellung	24
2.2.	Material und Methoden	27
2.3.	Auswertung und Ergebnisse	29
2.4.	Diskussion	38
2.5.	Zusammenfassung	40
	LITERATUR	41

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0077

1. UNTERSUCHUNG IM SYSTEM DER PEPTIDASE A

1.1. Einführung und Problemstellung

Peptidasen sind in Geweben des menschlichen Körpers weit verbreitet. Nach ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wandergeschwindigkeit, dem Muster ihrer Substratspezifität und ihrem Molekulargewicht konnten von LEWIS & HARRIS (1967) und RAPLEY, LEWIS, HARRIS (1971) sieben Enzyme charakterisiert werden, die als Peptidase A, B, C, D, E, F und S bezeichnet werden.

Die Peptidase A (E.C. 3.4.11) ist eine reine Dipeptidase, die jedoch eine Vielzahl verschiedener Dipeptide hydrolysiert. Obwohl sie in den meisten Geweben gefunden wird, wurden die chemischen und elektrophoretischen Untersuchungen überwiegend mit roten Blutkörperchen durchgeführt.

LEWIS & HARRIS (1967, 1969) und LEWIS, CORNEY, HARRIS (1968) identifizierten mit der Stärkegelelektrophorese insgesamt acht Phänotypen Pep A1, Pep A2, Pep A2-1, Pep A3-1, Pep A4-1, Pep A5-1, Pep A6-1, Pep A7-1 in Kollektiven aus Europäern, Indern und Afrikanern.
Den steuernden autosomalen Allelen gaben die Untersucher die entsprechende Bezeichnung Pep A^1 bis Pep A^7.

In europäischen Populationen fand LEWIS (1967) Pep A^1 als normales Allel; in afrikanischen Bevölkerungen berechnete er für Pep A^2 eine Häufigkeit von 0,05 - 0,1.

Alle übrigen Allele waren sehr seltene genetisch determinierte Varianten und traten nur in heterozygoter Kombination mit Pep A^1 auf.

Einen genetisch determinierten Polymorphismus der Peptidase A konnte LEWIS erst 1973 aus weißen Blutzellen mit einer speziellen elektrophoretischen Methode nachweisen. Der Autor fand in einem Kollektiv von Europäern drei Phänotypen Pep A1, Pep A8-1, Pep A8 und in einer kleineren Gruppe von Nigerianern drei weitere, die er Pep A2, Pep A2-1, Pep A8-2 nannte. Den zugehörigen Allelen gab er die Bezeichnung Pep A^1, Pep A^2, Pep A^8 und berechnete als Frequenz bei Weißen für Pep A^1 0,747 und für Pep A^8 0,253.

CREAGAN et al. (1973) und ARTHUR et al. (1975) ordneten den Genen der menschlichen Peptidase A das Autosom 18 zu.

Die Existenz des von LEWIS 1973 entdeckten Peptidase A- Polymorphismus mit ähnlichen Genfrequenzen bei Weißen bestätigten KÖMPF et al. 1979 mit einer variierten Nachweismethode.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, populationsgenetische Daten der Bevölkerung Unterfrankens im System der leukozytären Peptidase A zu erstellen.

1.2. Material und Methodik

434 unverwandte, gesunde Blutspender aus dem unterfränkischen Raum wurden untersucht. Alle Personen sind in Unterfranken geboren und haben hier ihren festen Wohnsitz.

Zur Gewinnung der Leukozyten wurden 7 ml venöses Blut jedes Probanden in ein K-EDTA Röhrchen (Firma Greiner) gefüllt, das bereits 1 ml Hydroxyäthylstärke, mittleres Molekulargewicht 450 000, enthielt.
Nach kurzem Mischen sedimentierte das Blut bei Raumtemperatur 1-2 Stunden. Anschließend wurde das überstehende Plasma mit den darin suspendierten Leukozyten und Thrombozyten vorsichtig in ein Spitzglas (Firma Schott) überführt.
Die Probe wurde 10 Minuten scharf zentrifugiert, das Plasma verworfen, und die am Boden verbliebenen Leukozyten wurden frisch verarbeitet oder bis zur Weiterverwendung bei - 40° C gelagert.

Die Darstellung der Peptidase A erfolgte mittels horizontaler Hochspannungsstärkegel - Elektrophorese (s. Schemata) nach der von KÖMPF et al. 1979 angegebenen Methode.

Das kontinuierliche Puffersystem enthielt in der Brücke

0,165 M Trishydroxyaminomethan (Fa. Merck)

0,2 M L-Histidin-HCl-Monohydrat (Fa. Medac)

justiert mit 1 N Salzsäure auf ein pH von 6,0.

Der Gelpuffer war eine zehnfache Verdünnung des Brückenpuffers.

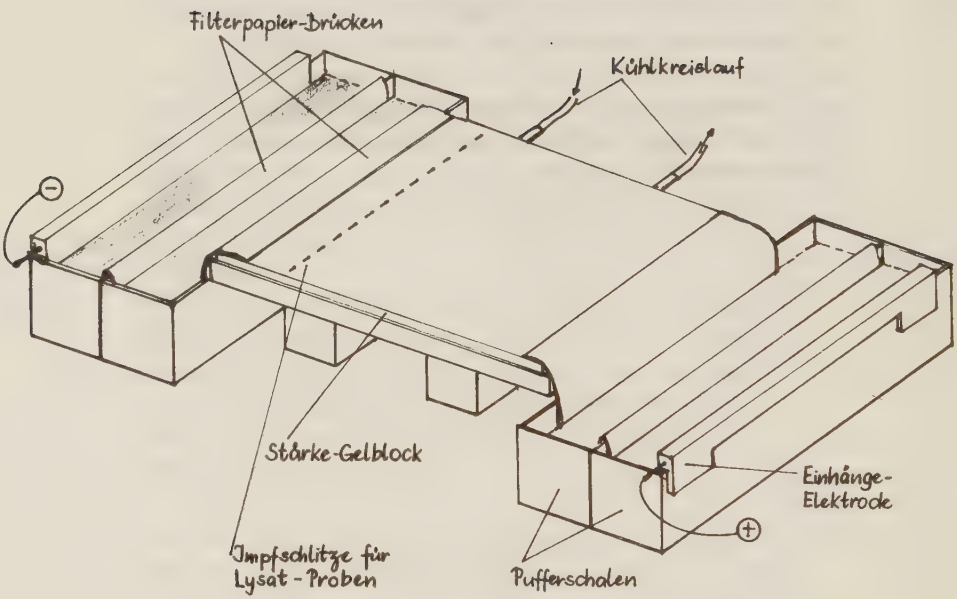
Als Trägersubstanz diente ein 18 % Stärkegel nach SMITHIES (Fa. Serva), das unter ständigem Rühren für 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend evakuiert wurde, um alle Luftblasen zu entfernen. Das heiße Gel wurde zu einem Block von 35 cm Länge, 25 cm Breite und 1 cm Höhe gegossen.
8 cm vom kathodischen Gelrand sparte ein Kamm aus hitzebeständigem Kunststoffmaterial die späteren Impfschlitze für das Untersuchungsmaterial aus. Er trug im Abstand von 0,5 cm Zinken von 1 cm Breite und wurde nach dem Erkalten des Gels vorsichtig gelockert und entfernt.

Für die Lysatherstellung wurden die Leukozytenproben mit einer gleichgroßen Menge einer 10 % Lösung Triton X-100 (Fa. Serva) versetzt und mit Ultraschall zerstört (Branson Sonifier, Cell disruptor, Modell B15, Microtip).
Die entstandenen Homogenisate wurden zu gleichen Teilen in ein Gemisch aus Sephadex G 200 und Saccharose überführt, das das sonst als Trägermaterial verwendete Filterpapier ersetzt, gründlich vermischt und blasenfrei zentrifugiert.

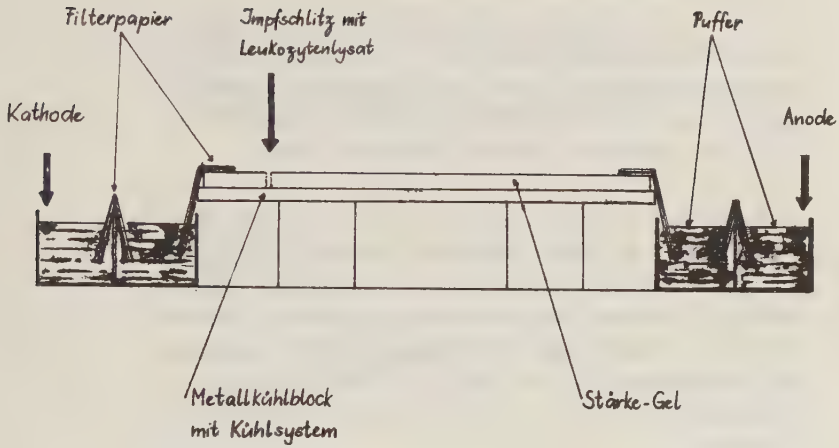
Eine 100 µl Probenmenge wurde unmittelbar vor Elektrophoresebeginn in die Impfschlitze pipettiert.

Die Auftrennung der Isoenzyme der Peptidase A erfolgte für 18 Stunden unter ständiger Kühlung bei + 4° C und einer angelegten Spannung von 9 V/cm.

Sechslagiges Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr. 0857) stellte die Verbindung her zwischen den Pufferschalen untereinander und zwischen Elektroden und Gelblock.
Während der gesamten Laufzeit war das Gel sorgfältig mit Klarsichtfolie abgedeckt, um es vor Austrocknung zu schützen.



Versuchsanordnung für die
horizontale Stärkegel-Elektrophorese



Horizontale Stärkegel-Elektrophorese

Wegen der relativ langen Laufzeit wurden wie bei LEWIS(1973) auf der Anoden- und Kathodenseite je zwei getrennte Pufferwannen verwendet, um p_H-Änderungen im Gel möglichst gering zu halten (Labyrinthsystem; ANNEKEN, 1978).

1.3. Auswertung und Ergebnisse

Die Isoenzyme der Peptidase A wanderten unter den Versuchsbedingungen zur Anode und lagen nach Abschluß der elektrophoretischen Auftrennung innerhalb der ersten 12 cm vom Startpunkt aus.

Dieser Gelteil wurde mit einem feinen Draht horizontal in 3 mm dicke Schnitte zerlegt. Die mittlere der entstandenen Schichten wurde nach der Sandwich-Methode zwischen mit Färbelösung getränkte Filterpapiere, (Schleicher & Schüll Nr. 2316), gebettet, mit Haushaltsfolie vor dem Austrocknen geschützt und 60-90 Minuten bei + 40° C im Brutschrank inkubiert.

Die Sichtbarmachung der Peptidase A - Aktivität beim Färbevorgang beruht nach RAPLEY et al. (1971) auf der Freisetzung von L-Alanin aus einem Dipeptid, z.B. Leucyl-Alanin und folgt der chemischen Reaktion:

$$\text{Leucyl-Alanin} + H_2O \xrightarrow{\text{Pep A}} \text{L-Alanin} + \text{Leucin}$$

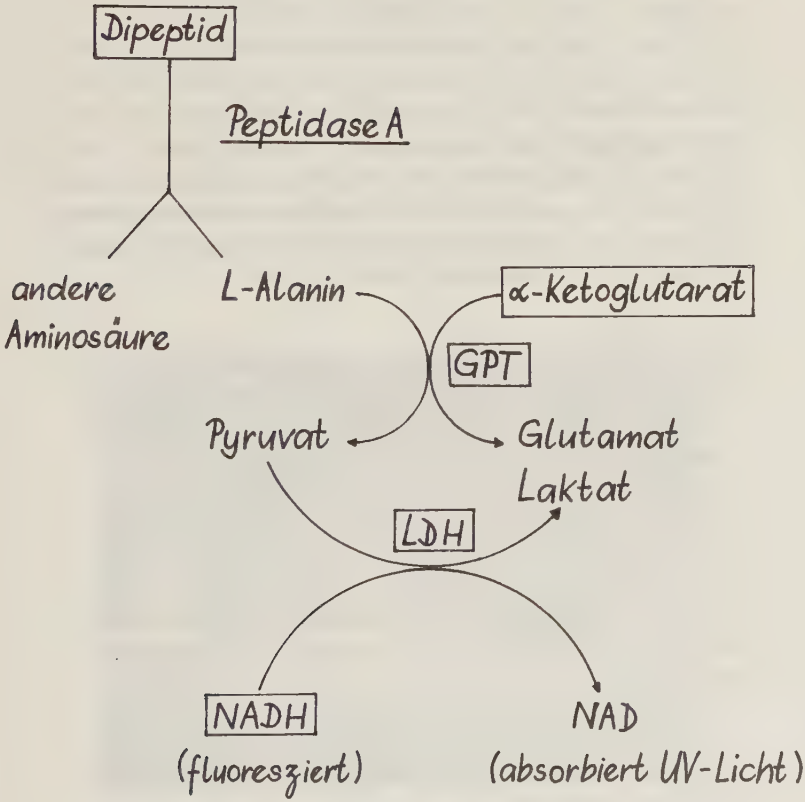
$$\text{L-Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{Pyruvat} + \text{Glutamat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + \text{NAD}$$

NAD absorbiert langwelliges UV - Licht, wohingegen NADH fluoresziert. Peptidase A - Aktivitäten zeigen sich deshalb als dunkle Absorptionsbanden auf fluoreszierendem Untergrund.

Färbesystem der Peptidase A

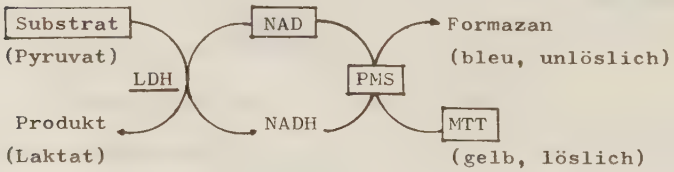
(Rapley, S., W.H.P. Lewis, and H. Harris)
1971



Die stets direkt vor Gebrauch hergestellte Färbelösung enthielt in einem 0,5 molaren Tris-HCl-Puffer (pH 8,2)

2 mg %	Leucyl-Alanin (Fa.Serva)
2 mg %	α-Ketoglutarat, Dinatriumsalz
1 mg %	NADH
0,5 mg %	MTT
3 µl/ml	GPT (Fa. Boehringer, 160 U/ml)
3 µl/ml	LDH (Fa. Boehringer, 5500 U/ml).

Das Auftreten der Enzymbanden kann mit UV-Licht der Wellenlänge 340 nm kontrolliert werden.
Da das NAD diffundiert und die Banden breiter werden (RAPLEY et al., 1971), wurde nach vollständiger Entwicklung die "Formazanreaktion" im PMS-Bad (10 mg % in Aqua dest.) ausgelöst (KÖMPF, 1972).



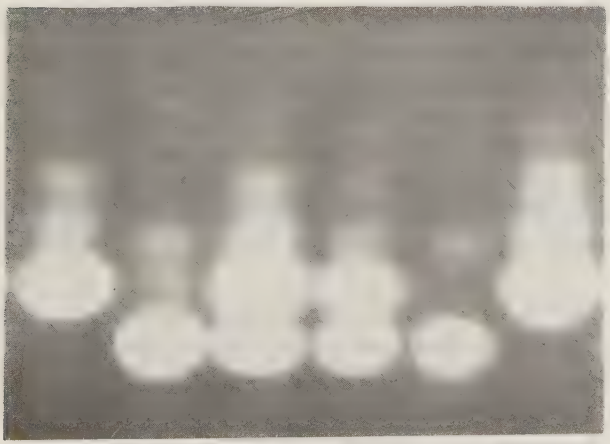
Die Peptidase A stellt sich danach hell auf tiefblauem Grund dar und ist bei Tageslicht abzulesen. Der Gelschnitt kann zur Konservierung eingefroren werden.

Alle Zymogramme wurden sowohl unter UV-Licht wie nochmals nach Abschluß der Formazanfärbung abgelesen, alle Ergebnisse photographisch festgehalten.

Es zeigten sich 5-6 cm anodisch vom Start die drei Phänotypen Pep A1, Pep A8 und Pep A8-1, die schon von LEWIS (1973) und KÖMPF (1979) aus Leukozytenlysaten beschrieben wurden.

Pep A1 und Pep A8 besaßen je eine Aktivitätszone, Pep A8 hatte eine um ca. 1 cm geringere elektrophoretische Wandergeschwindigkeit.

Der heterozygote Phänotyp Pep A8-1 zeigte zwei getrennte Zonen, jeweils in Position von Pep A1 und Pep A8.
Eine Lysatmischung in vitro von zwei Probanden mit dem Phänotyp Pep A1 bzw. Pep A8 entsprach unter den angegebenen Versuchsbedingungen dem Bild des zweibandigen heterozygoten Phänotyps Pep A8-1.

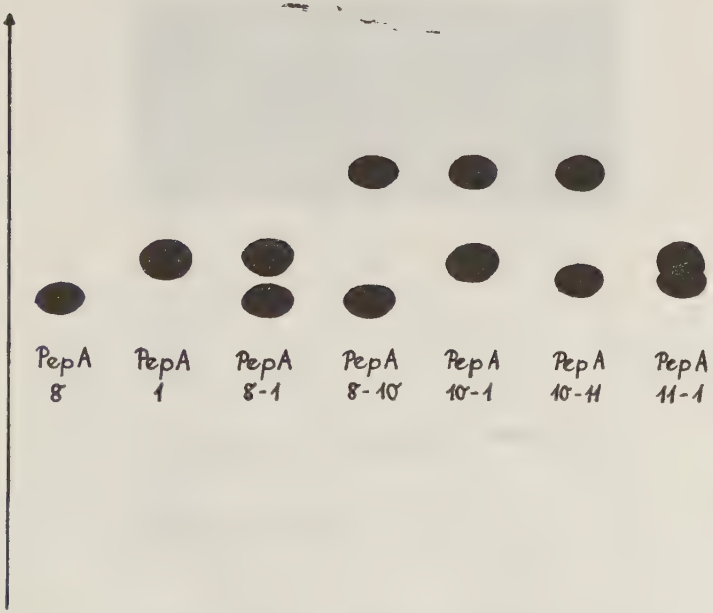


Pep A1 Pep A8 Lysat- Pep A8-1 8 1
Gemisch
in vitro
Pep A1,
Pep A8

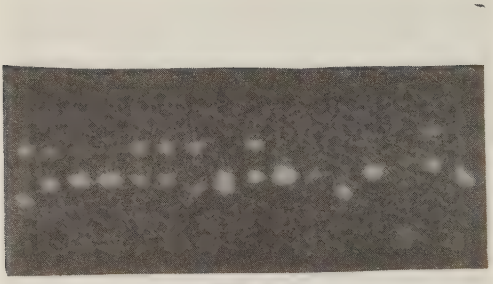
17 Probanden in dem untersuchten Kollektiv besaßen ein neues abweichendes Peptidaseaktivitätsmuster. Sie zeigten einerseits eine normale Aktivitätsbande in regelrechter Position Pep A1 bzw. Pep A8 und zusätzlich eine weitere genau gleicher Aktivität, die weiter anodisch lag.
Ihre Wandergeschwindigkeit bei der elektrophoretischen Auftrennung entsprach am ehesten der des homozygoten Phänotyps Pep A2, den LEWIS et al. (1967, 1973) aus Lysaten von verschiedenen afrikanischen Populationen dargestellt haben. Provisorisch wurden die beiden neuen Phänotypen Pep A2-1 und Pep A8-2 genannt (KONDLER, WIEBECKE, 1981).
Da jedoch nicht bewiesen werden konnte, daß beide Aktivitätsbanden Ausdruck desselben Peptidase - Isoenzyms sind, und die neue Variante unter völlig andersartigen Versuchsbedingungen gefunden wurde, wurde die Bezeichnung der Phänotypen in Pep A10-1 bzw. Pep A8-10 geändert.
Familienuntersuchungen (s. Schemata) der betreffenden Probanden bestätigten, daß die neue Aktivitätsbande von einem weiteren Allel des Peptidase A - Locus bestimmt wird, das kodominant-autosomal vererbt wird und das diese Personen in Kombination mit dem bekannten Allel Pep A^1 bzw. Pep A^8 als Heterozygote besitzen. Ihr Genotyp lautet entsprechend Pep A^{10} Pep A^1 bzw. Pep A^8 Pep A^{10}.

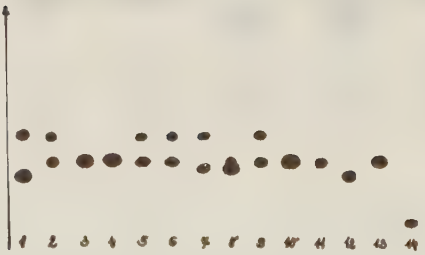
Eine zweite neue Variante fand sich während der Erstellung des Stammbaumes einer dieser Familien mit dem Gen Pep A^{10} (s. Stammbaumschema).
Ihre Aktivitätsbande zeigte eine intermediäre Wandergeschwindigkeit zwischen denen der Banden Pep A1 und Pep A8 und trat sowohl in Kombination mit Pep A^{10} wie mit der Bande von Pep A^1 auf.

Die neuen Phänotypen wurden Pep A11-1 und Pep A10-11 genannt.



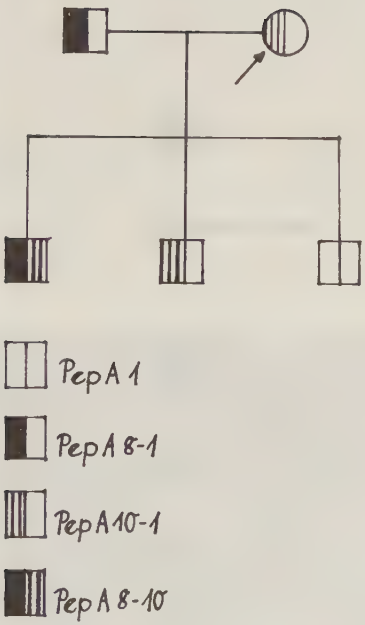
Phänotypen der leukozytären Peptidase A



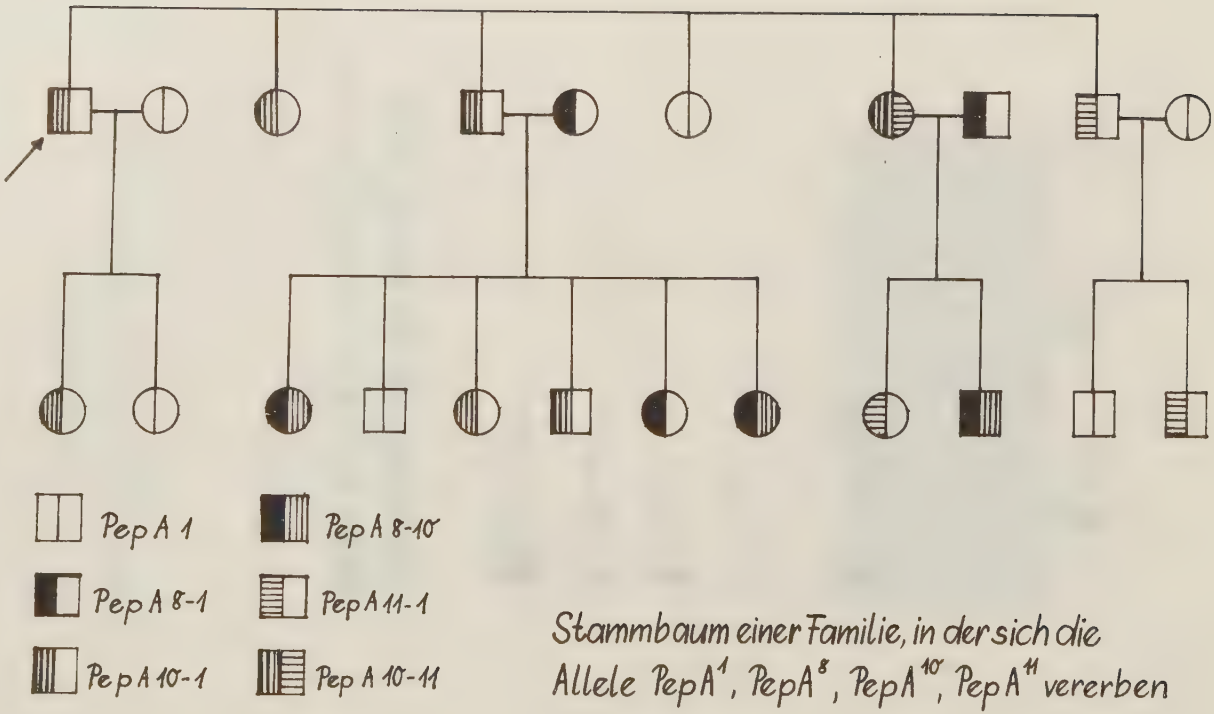


1. Pep A8-10
2. Pep A10-1
3. Pep A1
4. Pep A1
5. Pep A10-1
6. Pep A10-1
7. Pep A10-11
8. Pep A11-1
9. Pep A10-1
10. Pep A1
11. Pep A1
12. Pep A8
13. Pep A1
14. Thrombozyten-lysat mit Pep S

Gelschnitt nach dem PMS-Bad
(Peptidase A)



Stammbaum einer Familie, in der sich die Allele $PepA^{8}$, $PepA^{1}$ und $PepA^{10}$ vererben

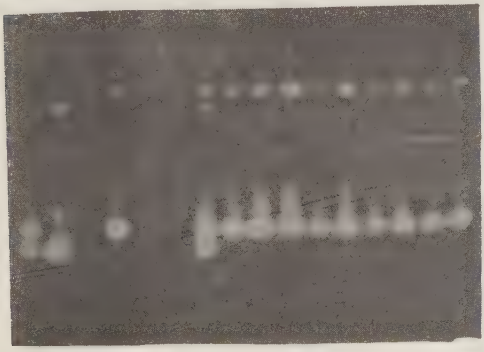


Stammbaum einer Familie, in der sich die Allele $PepA^{1}$, $PepA^{8}$, $PepA^{10}$, $PepA^{11}$ vererben

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen stellten sich noch zwei bis drei Vorbanden dar, mit variabler, zur Anode hin abnehmender und —im Vergleich zu den Hauptbanden— stets geringerer Aktivität. Sie wurden schon von LEWIS et al. (1967,1968) als "minor components" erwähnt und als mögliche Sekundärformen ("conformational isomers") der Hauptkomponenten gedeutet.
Nach langer Inkubationszeit traten sie besonders in der Formazanfärbung deutlich hervor. Sie blieben bei der Auswertung der Zymogramme unberücksichtigt.

(1)

(2)



1. Pep A8-1	9. Pep A1
2. Pep A8	10. Pep A1
3. --	11. Pep A1
4. Pep A1	12. Pep A1
5. --	13. Pep A1
6. --	14. Pep A1
7. Pep A8-1	15. Pep A1
8. Pep A1	16. Pep A1

Vorbanden bei normaler (1) und langer (2) Inkubation

Für die leukozytäre Peptidase A ergab sich in Unterfranken folgende Phänotypenverteilung :

Gesamtes Kollektiv (n = 434)

Phänotyp	beobachtet	erwartet
Pep A1	211	201,9
Pep A10-1	12	11,6
Pep A10	--	0,2
Pep A8-1	158	176,6
Pep A8-10	5	5,1
Pep A8	48	38,6
Summe	434	434,0

$Chi^2 = 4,82$

$p < 0,1$ bei $f = 2$

Als Genfrequenzen für die drei Allele berechneten sich :

$$\text{Pep } A^1 = 0,682$$

$$\text{Pep } A^{10} = 0,02$$

$$\text{Pep } A^8 = 0,298$$

1.4. Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen konnten den von LEWIS (1973) in Leukozytenlysaten gefundenen qualitativen Polymorphismus der Peptidase A erneut bestätigen.

Die beiden bekannten Allele Pep A^1 und Pep A^8 determinieren die homozygoten Phänotypen Pep A1 und Pep A8 und den heterozygoten Pep A8-1.

Die durchgeführten Familienuntersuchungen sprechen für einen autosomal-kodominanten Erbgang.

Die elektrophoretische Auftrennungsdifferenz von Pep A1 und Pep A8, die bei LEWIS (1973) nur 2-3 mm betrug, konnte durch die variierte Methode von KÖMPF (1979) auf ca. 1 cm erhöht werden.
Die Aktivität von Pep A8 in Leukozyten entsprach der von Pep A1, wohingegen Personen des Genotyps Pep A^8 in Erythrozyten eine deutlich verringerte Aktivität besitzen sollen (LEWIS, 1973).

Es scheint deshalb unwahrscheinlich, daß die geringere elektrophoretische Mobilität des Phänotyps Pep A8 Ausdruck einer verminderten Gesamtaktivität ist, und daß der von LEWIS (1973) beschriebene qualitative Peptidase A - Polymorphismus in Leukozyten lediglich ein quantitativer ist.(KÜHNL, SPIELMANN, 1975; ANNEKEN, 1978).

Das elektrophoretische Bild des heterozygoten Phänotyps Pep A8-1 stellte sich unter den angewandten Versuchsbedingungen wie auch bei KÖMPF 1979

als zwei getrennte Aktivitätsbanden dar, jeweils in Position des homozygoten Phänotyps Pep A8 bzw. Pep A1. Dieser Befund scheint nicht der Beobachtung von LEWIS (1973) zu entsprechen, der eine durchgehende Aktivitätszone zwischen Pep A1 und Pep A8 beschrieb, die er als dreibandig deutete. Bisher konnte dieses hypothetische Dreibandenmuster jedoch nicht photographisch überzeugend dokumentiert werden.

Auch die in dem untersuchten unterfränkischen Kollektiv neugefundenen vier Phänotypen Pep A8-10, Pep A10-1, Pep A11-1, Pep A10-11, deren Träger nach den Familienverteilungen für heterozygot gehalten werden müssen, zeigten ein nur zweibandiges Zymogramm, nicht das für dimere Enzyme charakteristische Dreibandmuster der Heterozygoten, obwohl die Peptidase A eine dimere Struktur besitzen soll (LEWIS & HARRIS, 1967).

Die ermittelten Genfrequenzen für die Allele Pep A^1 und Pep A^8 zeigen keine auffallende Differenz zu denen der Voruntersucher.

Frequenzen für Pep A^1 und Pep A^8 :

Untersucher		Pep A^1	Pep A^8
Lewis (1973)	n = 109	0,747	0,253
Kömpf (1979)	n = 182	0,73	0,27
diese Untersuchung (1980/81)	n = 434	0,682	0,298

Neben den beiden bereits bekannten häufigen Allelen fand sich in Unterfranken ein neues Allel, genannt Pep A^{10}, mit einer Häufigkeit von 0,02, sowie bei vier Mitgliedern einer Familie eine seltene Variante Pep A^{11}.
Stammbaumuntersuchungen weisen bei beiden Allelen auf einen autosomal-kodominanten Vererbungsmodus hin.
Ein Zusammenhang mit einer Erkrankung ergab sich bei keinem der Merkmalsträger.

Auffallend in dem untersuchten Kollektiv (n = 434) ist die Abweichung vom Populationsgleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($Chi^2 = 4,82$; $p < 0,1$ bei $f = 2$). Es besteht ein Überschuß an beobachteten Homozygoten der Phänotypen Pep A1 und Pep A8.
Denkbar wäre, daß sich in diesen Gruppen noch Heterozygote befinden; sie besäßen neben dem gängigem Allel Pep A^1 bzw. Pep A^8 eine seltene Variante, die sich in der elektrophoretischen Darstellung mit der angewandten Methode nicht erkennen ließe.
MARTIN und SACHS (1981) zeigten zur Schätzung der Genfrequenz eines "stummen" Allels in einem System eine Methode auf, für deren Anwendung bestimmte Voraussetzungen eingehalten werden müssen (SACHS, 1982) :

1. Zufälligkeit der Stichprobe
2. Einbeziehung aller Bestimmungen in den Kalkül
3. Überschuß an reinerbigen Typen, der zu hohen Werten von Chi-Quadrat führt.

Für das untersuchte Kollektiv, das diese Voraussetzungen erfüllt, ergibt sich nach dem Rechenmodell folgende Phänotypenverteilung :

Phänotyp	beobachtet	erwartet
I Pep A1	211	214,1
II Pep A10-1	12	12,0
III Pep A10	--	1,0
IV Pep A8-1	158	158,0
V Pep A8-10	5	5,0
VI Pep A8	48	43,1
VII Pep A0	--	0,8
Summe	434	434,0

$Chi^2 = 2,4$

$p < 0,5$ bei $f = 3$

Faßt man II, III, V und VII zusammen, erhält man :

$Chi^2 = 0,774$

$p < 0,9$ bei $f = 3$

Als Genfrequenz für die vier Allele berechnet sich :

$$\text{Pep } A^1 = 0,6609$$
$$\text{Pep } A^{10} = 0,0209$$
$$\text{Pep } A^8 = 0,2754$$
$$\text{Pep } A^0 = 0,0428$$

1.5. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Hochspannungsstärkegel-Elektrophorese wurden nach der von KÖMPF et al. 1979 angegebenen Methode 434 Personen aus Unterfranken im System der leukozytären Peptidase A untersucht.

Als Genfrequenz berechnete sich für das Allel

	Pep A^1	0,682
für	Pep A^8	0,298

Es fand sich in der unterfränkischen Population außerdem ein neues, genetisch determiniertes, autosomal-kodominant vererbtes Allel Pep A^{10} mit einer Häufigkeit von 0,02.

Familienuntersuchungen zeigten zusätzlich eine Variante Pep A^{11} auf, deren Segregation ebenfalls nachgewiesen werden konnte.

2. UNTERSUCHUNG IM SYSTEM DES MALATENZYMES

2.1. Einführung und Problemstellung

Das Malatenzym (L-Malat : NADP-Oxidoreduktase, Oxalacetat decarboxylierend, E.C. 1.1.1.40) kommt in Geweben verschiedener Säugetierspezies in zwei subzellulären Formen vor, als ME_S (S = solubel) im Zytoplasma und als ME_M (M = mitochondrial) in den Mitochondrien.
Das Enzym ist streng NADP-abhängig und katalysiert die oxidative Decarboxylierung von L-Malat zu Pyruvat und die Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat.

$$\text{L-Malat} + \text{NADP} \xrightarrow{Mn^{2+} \text{ oder } Mg^{2+}} \text{Pyruvat} + CO_2 + \text{NADPH}$$

Die zytoplasmatische Form, die zuerst aus Taubenleber isoliert und charakterisiert wurde (OCHOA et al., 1948; RUTTER & LARDY, 1958; HSU & LARDY, 1967) ist wichtig für die Lieferung von NADPH zur Lipogenese. Hauptsächlich findet sich ME_S im weißen Fettgewebe und in der Leber. Seine Aktivität steigt besonders bei kohlenhydratreicher Ernährung, die die Fettsäuresynthese begünstigt.

Das mitochondriale Enzym wurde aus Nebennieren- und Herzgewebe vom Rind gereinigt (SIMPSON, ESTABROOK, 1969; FRENKEL, 1971). Es kommt in großen Mengen auch im Gehirn und in den Nieren vor und stellt wohl NADPH für Steroidhydroxylation und Elektronentransport bereit.

Beide Enzymformen werden von zwei unabhängigen Loci gesteuert. Durch Untersuchungen an Zellhybriden konnte den Genen der mitochondrialen Form das 1q Chromosom beim Menschen zugeordnet werden, denen der solublen Form das Chromosom 6 (POVEY et al., 1975; CHEN et al., 1973).

Einen genetisch determinierten Polymorphismus des Malatenzyms entdeckten COHEN & OMENN 1971/72. Während beim Affen (Macaca nemestrina) beide Enzymformen einen Polymorphismus besitzen, scheint dies beim Menschen nur für das mitochondriale Enzym zu gelten.

Zwei häufige Allele ME_M^1 und ME_M^2 bestimmen in homozygoter und heterozygoter Kombination drei unterschiedliche Phänotypen.

Weitere Ergebnisse zum System des menschlichen Malatenzyms lieferten POVEY et al., 1975; BURCHELL et al., 1977; SAHA et al., 1978 und bestätigten die Befunde von COHEN & OMENN (1972).

Alle Untersuchungen hatten Gewebeproben als Ausgangsmaterial, hauptsächlich Gehirnextrakte, die post mortem gewonnen waren, da das mitochondriale Enzym in Bestandteilen des menschlichen Blutes (Erythrozyten, Leukozyten, Serum) nach den Untersuchungen von COHEN & OMENN nicht nachweisbar war. Familienanalysen waren deshalb nur sehr mühsam mit kultivierten Hautfibroblasten durchführbar.

SIEBERT et al., 1979, zeigten, daß beide Formen des Malatenzymes in menschlichen Leukozyten vor-

kommen und stellten den bekannten Polymorphismus der mitochondrialen Form mit Routinemethoden der Stärkegel - Elektrophorese dar.

Die durchgeführte Untersuchung sollte überprüfen, ob im System des Malatenzyms mit der Methode von SIEBERT et al. aus Blut formal- und populationsgenetische Daten routinemäßig gewonnen werden können.

2.2. Material und Methodik

Es wurden 434 unverwandte, gesunde Blutspender, deren Geburtsort in Unterfranken liegt, untersucht. Das Kollektiv war mit dem im System der Peptidase A untersuchten identisch.

Die gesamte Versuchsanordnung sowie die Proben- und Lysatgewinnung entsprach der zur Untersuchung der Peptidase A.

Das kontinuierliche Puffersystem, pH 7,6, enthielt in der Brücke

0,2 M Trishydroxyaminomethan und

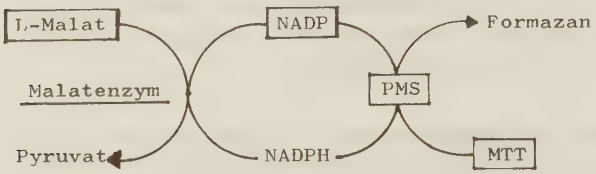
0,2 M Histidin-HCl-Monohydrat.

Der Gelpuffer war eine siebenfache Verdünnung des Brückenpuffers.

Das verwandte Stärkegel (SMITHIES) hatte eine Konzentration von 18 %.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 18 Stunden bei einer angelegten Spannung von 5 Volt/cm unter ständiger Kühlung bei + 4° C.

Die Sichtbarmachung der Malat - Isoenzyme folgt dem Schema :



In einer Substratlösung aus

3 g %	L-Malat
6 g %	Trishydroxyaminomethan
1 g %	$MgCl_2$ (pH 7,4)

wurden —wegen der Lichtempfindlichkeit der Färbelösung— unmittelbar vor Gebrauch folgende Reagenzien gelöst :

50 mg %	NADP
25 mg %	MTT
100 µl %	einer 1 % Lösung Meldolablau (Fa. Boehringer), alternativ eine Spur PMS.

Die Gelschnitte inkubierten, angefärbt nach der Sandwich-Methode, (Filterpapier Schleicher & Schüll Nr. 2316), im Dunklen 40-60 Minuten bei + 37° C im Brutschrank.

2.3. Auswertung und Ergebnisse

Es stellten sich die drei Phänotypenmuster, ME_M 1, ME_M 2, ME_M 2-1, anodisch vom Start in einem ca. 4 cm breiten Bereich dar.

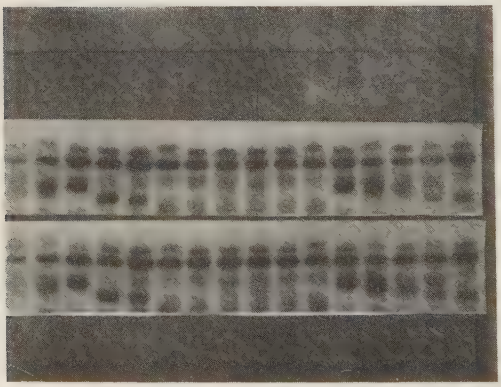
Die homozygoten Phänotypen zeigten je eine Bande, wobei ME_M 2 etwa doppelt soweit zur Anode wanderte wie ME_M 1.
Der heterozygote Phänotyp ME_M 2-1 hatte eine breite homogene Aktivitätszone intermediärer Position. Bei einer in vitro Lysatmischung zweier Probanden der Phänotypen ME_M 1 bzw. ME_M 2 stellten sich, getrennt durch eine aktivitätsfreie Zone, die homozygoten Banden als Zweibandmuster dar.

Anodisch an ME_M 2 und ME_M 2-1 anschließend färbte sich die soluble Form der Malatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) mit an. Sie ist nicht streng NAD-abhängig und besitzt keinen Polymorphismus (DAVIDSON & CORTNER, 1967).
Wurde in der Färbelösung NADP durch NAD ersetzt, so konnte die MDH_S zum Vergleich alleine dargestellt werden.

Die soluble Form des Malatenzyms besitzt beim Menschen gegenüber der mitochondrialen die größere elektrophoretische Wandergeschwindigkeit. Die beiden Banden der ME_S lagen in wechselnder Intensität anodisch der MDH_S.

Phänotypen des Malatenzyms (ME_M)

ME_M 1 ME_M 2 Lysat-Gemisch in vitro ME_M 1+2 ME_M 2-1 ME_M 2-1^V ME_M 3-1 ME_M 3-2

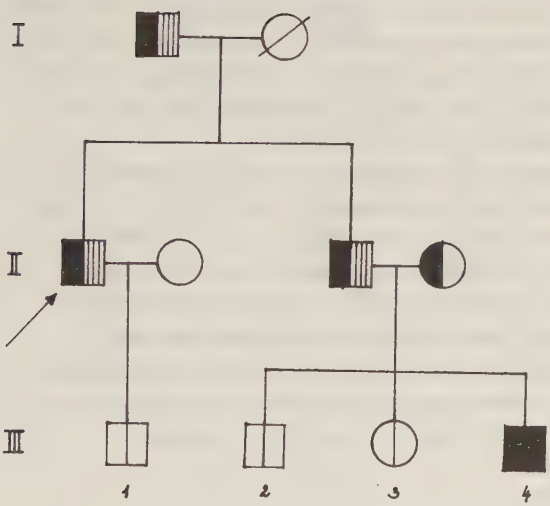


1. ME_M 2-1
2. ME_M 2-1^V
3. ME_M 2
4. ME_M 1
5. ME_M 1
6. ME_M 3-1
7. ME_M 3-1
8. ME_M 3-2
9. ME_M 3-2
10. ME_M 3-1
11. ME_M 3-1
12. ME_M 2
13. ME_M 2-1^V
14. ME_M 2-1
15. Lysat-Gemisch ME_M 1+2
16. ME_M 1

Während COHEN & OMENN (1972) zwischen Individuen mit dem Merkmal ME_M 2-1 keinen Unterschied in der elektrophoretischen Ausprägung des Phänotyps feststellten, fanden sich in dem unterfränkischen Kollektiv vier Probanden mit einem abweichenden Muster ME_M 2-1.
Die Aktivität der heterozygoten Bande war nicht gleichmäßig verteilt, sondern zugunsten der Position ME_M 2 verstärkt. Der weniger anodische Anteil der Aktivitätszone war dagegen stark abgeschwächt, so daß das Zymogramm eine geringere Ausdehnung zu haben schien als der "normale" Phänotypus.
Familienuntersuchungen ließen erkennen, daß diese Personen formalgenetisch wohl heterozygot für die Allele ME_M^1 und ME_M^2 sein müssen, da sie fähig sind, beide zu vererben.
Es wäre denkbar, daß diese Untersuchten das Allel ME_M^1 in einer abgeschwächten, vererbbaren Variante ME_M^{1V} besitzen, was bei heterozygoten Trägern dieses Merkmales bei der elektrophoretischen Auftrennung offenbar wird, nicht aber bei Homozygoten (Genotyp ME_M^1 ME_M^{1V}), die auch ein normales Allel ME_M^1 besitzen.
Für die statistische Auswertung blieben diese Personen unberücksichtigt.

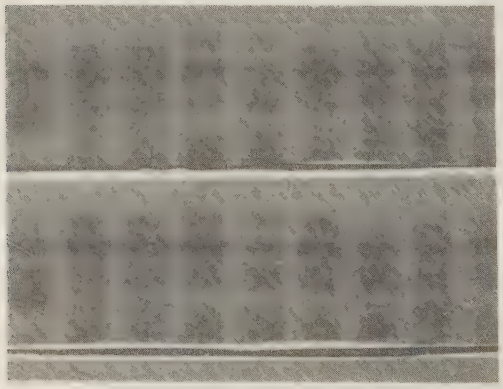
$ME_M 2$ $ME_M 2\text{-}1^V$ $ME_M 2\text{-}1$ Lysat-Gemisch $ME_M 1+2$ $ME_M 1$

$ME_M 2\text{-}1^V$ $ME_M 2\text{-}1$

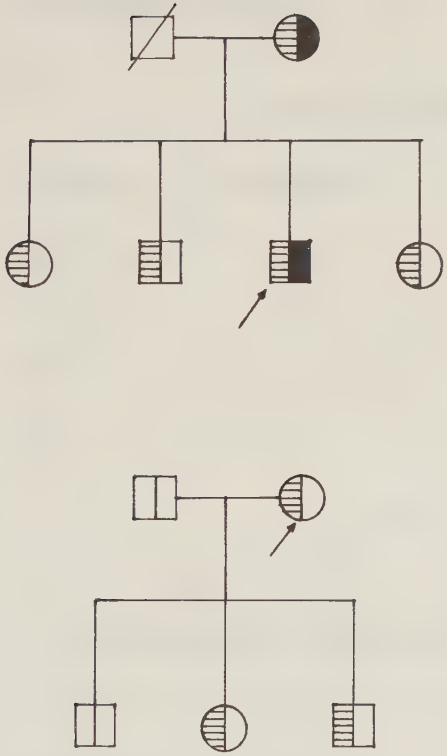


Vererbung von ME_M^{1V}

Neben den bekannten drei Phänotypen fanden sich in Unterfranken zwei weitere. Die Ergebnisse der Familienverteilungen wiesen darauf hin, daß diese beiden Phänotypen Ausdruck eines dritten Allels ME_M^3 sein müssen, jeweils in Kombination mit den Allelen ME_M^1 bzw. ME_M^2. Sie wurden deshalb mit ME_M 3-1 und ME_M 3-2 bezeichnet.
Beide Phänotypen besaßen ein Aktivitätsmuster, das direkt am Start begann. Das von ME_M 3-1 endete in Höhe der Position ME_M 1, das von ME_M 3-2 stellte sich als durchgehende Zone dar bis in Höhe der löslichen Form der Malatdehydrogenase und zeigte im Bereich der Position von ME_M 1 zwei schmale, etwas kräftiger angefärbte Banden. Sein Zymogramm könnte als Fünfbandenmuster eines tetrameren Enzyms interpretiert werden.



ME_M 2-1^V 3-2 3-2 3-1 3-1 3-1 3-1 1



Segregation des Allels ME_M^3

Für das Malatenzym in Unterfranken ergaben sich nach der Auswertung folgende Phänotypen-Häufigkeiten :

Gesamtes Kollektiv (n = 434)

Phänotyp	beobachtet	erwartet
ME_M 1	182	185,2
ME_M 2-1	203	196,6
ME_M 2	49	52,2
Summe	434	434,0

$Chi^2 = 0,4568$
$p < 0,5$ bei $f = 1$

Frauen (n = 125) und Männer (n = 309)

Phänotyp	Frauen		Männer	
ME_M 1	58	57,1	124	128,2
ME_M 2-1	53	54,8	150	141,7
ME_M 2	14	13,1	35	39,1
Summe	125	125,0	309	309,0
	$Chi^2 = 0,129$		$Chi^2 = 1,064$	
	$p < 0,8$		$p < 0,4$	

Für die steuernden Gene ME_M^1 und ME_M^2 wurden folgende Frequenzen berechnet :

$$ME_M^1 = 0,653$$

$$ME_M^2 = 0,347$$

2.4. Diskussion

Die durchgeführte Untersuchung konnte aus menschlichen Leukozytenlysaten die Aktivitätsmuster der drei bekannten Phänotypen, ME_M 1, ME_M 2-1, ME_M 2, des mitochondrialen Malatenzyms darstellen. Sie stimmten mit denen aus post mortem gewonnenen Gehirn- und Herzextrakten überein.

Die ermittelten Genfrequenzen für die steuernden Allele ME_M^1 und ME_M^2 waren den von den Voruntersuchern bei Weißen gefundenen sehr ähnlich.

Untersucher		Frequenz für ME_M^1	
Cohen & Omenn (1972)	n = 132	0,69	Untersuchungen aus Gewebeproben
Povey et al. (1975)	n = 60	0,69	
Burchell et al. (1977)	n = 66	0,63	
Saha et al. (1978)	n = 409	0,65	
Siebert et al. (1979)	n = 184	0,67	Untersuchungen aus Leukozyten
diese Untersuchung (1980/81)	n = 434	0,65	

Es ergab sich kein Unterschied in der Phänotypenverteilung zwischen beiden Geschlechtern und keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

COHEN & OMENN (1971/72) hatten in ihrem erstuntersuchten Kollektiv (n = 132) bei männlichen Weißen Nordamerikas einen signifikanten Überschuß des heterozygoten Phänotyps ME_M 2-1 beobachtet; in den nachfolgend untersuchten Populationen konnte dieser Befund nicht bestätigt werden (POVEY (1975), BURCHELL (1977), SAHA (1978), GHOSH (1980)). Er wird für möglicherweise zufallsbedingt gehalten und ließ sich auch in der Bevölkerung Unterfrankens nicht feststellen.

Die Ergebnisse bestätigen, daß das Malatenzym in Leukozyten aus peripherem Blut nachweisbar ist und der Polymorphismus der mitochondrialen Form mit Routinemethoden der Stärkegelelektrophorese bestimmt werden kann.

Die günstige Verteilung der beiden häufigen Allele ME_M^1 und ME_M^2 und die leichte Bestimmbarkeit ermöglicht, das Enzym künftig für die forensische Paternitätsserologie heranzuziehen (isolierte ısschlußchance 15 %). Da die Frequenz für ME_M^1 wischen verschiedenen Populationen große Unterschiede aufweist, (Weiße 0,65; amerikan. Neger 0,82; Inder 0,56), könnte das Malatenzym auch ein nützlicher Marker für die Populationsgenetik werden (GHOSH et al., 1980).

2.5. Zusammenfassung

Die Darstellung des Polymorphismus der mitochondrialen Form des Malatenzyms ist mit Routinemethoden der Stärkegelelektrophorese aus Leukozyten möglich.

Nach der von SIEBERT et al. 1979 angegebenen Methode wurden 434 Personen aus Unterfranken im System des mitochondrialen Malatenzyms (ME_M) untersucht.

Die Phänotypenmuster stimmen mit denen aus post mortem gewonnenen Gewebeextrakten überein.

Als Genfrequenz wurde

für ME_M^1 0,653,

für ME_M^2 0,347

ermittelt. Eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ergab sich nicht.

Es fand sich in Unterfranken ein neues Allel ME_M^3, das in heterozygoter Kombination mit ME_M^1 und ME_M^2 auftrat und dessen Segregation nachgewiesen werden konnte.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Anneken, K. — Das Isoenzymsystem der Peptidasen. Frankfurt/M., Dissertation (1978)

2. Arthur, E., C.M. Steel, H.J. Evans, S. Povey, B. Watson, H. Harris — Genetic studies on human lymphoblastoid cell lines: isozyme and cytogenetic heterogeneity in a cell line, with evidence for localization of the Pep A locus in man. Ann. Hum. Genet. 39, 33-42 (1975)

3. Burchell, A., A. Crosby, P.T.W. Cohen — Human mitochondrial malic enzyme variants: properties of the different polymorphic forms. Ann. Hum. Genet. 41, 1-7 (1977)

4. Chen, T.R., F.A. McMorris, R. Creagan, F. Ricciuti, J. Tischfield, F. Ruddle — Assignment of the genes for malate oxidoreductase decarboxylating to chromosome 6 and peptidase B and lactate dehydrogenase B to chromosome 12 in man. Amer. J. Hum. Genet. 25, 200-207 (1973)

5. Cohen, P.T.W. — Mitochondrial malic enzyme: a new polymorphism in man and Macaca nemestrina. Fed. Proc. 30, 1207 (part II abst.) (1971)

6. Cohen, P.T.W., G.S. Omenn — Human malic enzyme: high frequency polymorphism of the mitochondrial form. Biochem. Genet. 7, 303-311 (1972)

7. Creagan, R., J. Tischfield, F.A. McMorris, S. Chen, M. Hirschi, T.R. Chen, F. Ricciuti, F.H. Ruddle — Assignment of the genes for human peptidase A to chromosome 18 and cytoplasmic glutamic oxaloacetate transaminase to chromosome 10 using somatic-cell hybrids. Cytogenet. Cell Genet. 12, 187-198 (1973)

8. Davidson, R.G., J.A. Cortner — Genetic variant of human erythrocyte malate dehydrogenase. Nature 215, 761-762 (1967)

9. Davidson, R.G., J.A. Cortner — Mitochondrial malate dehydrogenase: a new genetic polymorphism in man. Science 157, 1569-1571 (1967)

10. Frenkel, R., — Bovine heart malic enzyme I. Isolation and partial purification of a cytoplasmic and a mitochondrial enzyme. J. Biol. Chem. 246, 3069-3074 (1971)

11. Ghosh, U., P.K. Banerjee, N. Saha — Mitochondrial malic enzyme polymorphism in an Indian population. Hum. Hered. 30, 159-160 (1980)

12. Harris, H., D.A. Hopkinson — Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics Amsterdam: North-Holland (1976)

13. Hsu, R.Y., H.A. Lardy — Pigeon liver malic enzyme II. Isolation, crystallization, and some properties. J. Biol. Chem. 242, 520-526 (1967)

14. Kühnl, P., W. Spielmann — Untersuchungen zum Polymorphismus der Peptidase A. Ref. 6.Int. Tagg. Ges. f. forens. Blutgruppenkunde 1.-5.Okt. 1975, Innsbruck

15. Kömpf,J. — Zytoplasmatische Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC.:2.6.12) Bestimmungstechnik Ärztl. Lab. 18, 25-26 (1972)

16. Kömpf, J., G. Siebert, H. Ritter — Common polymorphism of Peptidase A: formal genetics and population data. Hum. Genet. 51, 323-325 (1979)

17. Kondler, R., D. Wiebecke — Studie zur Populationsgenetik der Peptidase A (E.C. 3.4.11) und des mitochondrialen Malatenzyms in der Bevölkerung Unterfranken. Ref. 9.Int. Tagg. Ges. f. forens. Blutgruppenkunde 29.9.-3.10.1981, Bern

18. Lewis, W.H.P., H. Harris — Human red cell peptidases. Nature 215, 351-355 (1967)

19. Lewis, W.H.P., G. Corney, H. Harris — Pep A5-1 and Pep A6-1: two new variants of peptidase A with features of special interest. Ann. Hum. Genet. 32, 35-42 (1968)

20. Lewis, W.H.P., H. Harris — Molecular size estimates of human peptidases determined by separate gene loci. Ann. Hum. Genet. 33, 89-92 (1969)

21. Lewis, W.H.P. — Common polymorphism of Peptidase A: electrophoretic variants associated with quantitative variation of red cell levels. Ann. Hum. Genet. 36, 267-271 (1973)

22. Martin, W., V. Sachs — Eine einfache Methode zur Berechnung der Genfrequenzen stummer Gene. Ref. 9.Int. Tagg. Ges. f. forens. Blutgruppenkunde 29.9.-3.10.1981, Bern

23. Ochoa, S., A. Mehler, A. Kornberg — Reversible oxidative decarboxylation of malic acid. J. Biol. Chem. 167, 871 (1947)

24. Povey, S., D.E.Jr. Wilson, H. Harris, I.P. Gormley, P. Perry, K.E. Buckton
Subunit structure of soluble and mitochondrial malic enzyme: demonstration of human mitochondrial enzyme in human-mouse hybrids.
Ann. Hum. Genet. 39, 203-212 (1975)

25. Rapley, S., W.H.P. Lewis, H. Harris
Tissue distributions, substrate specifities and molecular sizes of human peptidases determined by separate gene loci.
Ann. Hum. Genet. 34, 307-319 (1971)

26. Rutter, W.J., H.A. Lardy
Purification and properties of pigeon liver malic enzyme.
J. Biol. Chem. 233, 374 (1958)

27. Sachs, V.
Persönliche Mitteilung (1982)

28. Saha, N., S.J. Jeremiah, S. Povey
Further data on mitochondrial malic enzyme in man.
Hum. Hered. 28, 421-425 (1978)

29. Siebert, G., H. Ritter, J. Kömpf
Mitochondrial malic enzyme (E.C. 1.1.1.40) in human leukocytes: formal genetics and population genetics.
Hum. Genet. 51, 319-322 (1979)

30. Simpson, E.R., R.W. Estabrook — Mitochondrial malic enzyme: the source of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate for steroid hydroxylation in bovine adrenal cortex mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 129, 384-395 (1969)

31. — Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy (1960)

Herrn Prof. Dr. D. Wiebecke darf ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Übernahme des Referates herzlich danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Schwerd für seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Kömpf (Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, Vorstand Prof. Dr. Dr. H. Ritter) für die Vielzahl seiner wertvollen Ratschläge und Anregungen.

LEBENSLAUF

Name:	Roswitha, Barbara Kondler
Geburtsdatum:	19.03.1953
Geburtsort:	Coburg
Eltern:	Franz Kondler, Maria Kondler, geb. Mitlöhner

Schulbildung:

1959 - 1963	Volksschule Coburg
1963 - 1972	Gymnasium Alexandrinum in Coburg
1972	Reifeprüfung

Studium:

1972 - 1978	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
August 1974	Ärztliche Vorprüfung
August 1975	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1977	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1978	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 1978	Approbation als Arzt

Weiterbildung:

seit Dezember 1978	Assistenzärztin in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg

Roswitha Kondler